

JULIANA CHIESSE DA SILVA

**ESTABELECIMENTO DO CULTIVO DOS NEMATÓIDES  
Caenorhabditis elegans, Panagrellus redivivus E  
Turbatrix aceti E AVERIGUAÇÃO DESTES COMO  
BIOINDICADORES À PRESENÇA DE CHUMBO.**

CURITIBA  
2004

JULIANA CHIESSE DA SILVA

**ESTABELECIMENTO DO CULTIVO DOS NEMATÓIDES  
Caenorhabditis elegans, Panagrellus redivivus E  
Turbatrix aceti E AVERIGUAÇÃO DESTES COMO  
BIOINDICADORES À PRESENÇA DE CHUMBO.**

Monografia apresentada para conclusão do Curso  
de Bacharelado em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná, no  
Departamento de Biologia Celular.  
Orientador: Prof. Marco A. F. Randi

CURITIBA  
2004

## AGRADECIMENTOS

A Marco e Ruth, que possibilitaram a realização desse trabalho;  
Aos colegas de laboratório, que sempre deram aquela “forcinha”;  
Aos amigos que, mesmo não sabendo do que se tratava, sempre estiveram  
dispostos em ajudar;  
Aos pais e irmãos, pelo apoio de sempre;  
Aos componentes da banca examinadora, professores Dra. Lucélia Donatti e  
Dr. Walter Pereira Boeger;  
Ao Prof. Carlos Winter e alunos, cujos vermes e ajuda foram indispensáveis;  
Ao Renato, amigo e companheiro de todas as horas;  
Não há nada mais completo e que diga tanto quanto:  
“Obrigada”.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	v
1. Introdução .....	1
1.1. Nematóides .....	4
1.1.1 <u>Caenorhabditis elegans</u> .....	5
2.1. Objetivo Geral: .....	11
2.2. Objetivos específicos: .....	11
3. Materiais e métodos .....	12
3.1. <u>Caenorhabditis elegans</u> .....	12
3.1.2. Cultura Sincronizada (Willians and Dusenbery, 1988 in Tartara, 1998) .....	14
3.2. <u>Turbatrix aceti</u> .....	15
3.3. <u>Panagrellus redidivus</u> .....	15
3.4. Preparação de Lâminas .....	15
3.5. Contaminação .....	16
3.6. Métodos Estatísticos .....	17
4. Resultados .....	17
5. Discussão .....	23
6. Conclusões .....	27
7. Referências Bibliográficas .....	28

## RESUMO

A substituição de pequenos mamíferos e peixes por invertebrados em bioensaios está se tornando rotineira. Os nematóides prometem ser bons bioindicadores por apresentarem características que garantem resultados rápidos e tão eficazes quanto os modelos mais tradicionais, além de possibilitarem sua correlação com outros organismos mais complexos, incluindo o Homem. Buscando avaliar o uso de nematóides em estudos ecotoxicológicos, exemplares de Caenorhabditis elegans, Panagrellus redivivus e Turbatrix acetii foram expostos à 2,6 mM, 0,26 mM e 0,026 mM de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  diluídos em meio K por 24h. Cada grupo contaminado era composto, em média, por 10 indivíduos, assim como o controle. Foram comparados os números de sobreviventes entre os grupos e entre as espécies. O C. elegans demonstrou maior sensibilidade ao Pb, seguido do P. redivivus que apresentou a “melhor resposta”, e o mais resistente à exposição foi o T. acetii. Apesar do C. elegans ser o nematóide mais conhecido cientificamente por seu uso como modelo biológico para os mais diversos tipos de experimentos, indica-se o Panagrellus redivivus como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos, não apenas pela resposta ao xenobionte, mas também pela facilidade de manipulação e manutenção de cultivo desta espécie.

# 1.Introdução

Com os desenvolvimentos tecnológico, industrial e urbano melhora-se a qualidade de vida e a praticidade no cotidiano. Por outro lado, as consequências do uso da tecnologia e a exploração dos recursos naturais necessários ao seu desenvolvimento e manutenção, por vezes afetam o ar, a água, o solo e os seres que usufruem desses meios, incluindo o Homem.

Acreditava-se que, pela quantidade em que eram encontrados esses recursos, eles seriam inesgotáveis. Hoje, sabe-se que são limitados e o descuido destas reservas compromete o futuro.

Há relatos sobre o impacto das ações antrópicas durante a revolução industrial de 1850, como poluição por arsênio e fumaça industrial. Em 1887, na Alemanha, constatou-se a morte veados *Darma darma* por emissões de arsênio de uma fundição de prata (HOFFMAN *et al*, 1995). Além dos históricos acidentes ambientais como os de Chernobil e de Goiânia, são várias as constatações de contaminação do ambiente por substâncias nocivas tanto ao homem quanto aos demais organismos, como a do Vale do Ribeira no Paraná devido à mineração de chumbo; contaminação por mercúrio dos garimpeiros da Serra Pelada e demais mineradores de ouro da região Norte do Brasil; o vazamento de petróleo em julho de 2000 da refinaria da Petrobrás, atingindo os rios Barigüi e Iguaçu. Vale ressaltar os casos de contaminação por substâncias tóxicas a longo prazo e de resposta não-imediata, como o uso de pesticidas e agrotóxicos (organoclorados e organofosforados), produtos como TBT, utilizado para proteger cascos de navio; produtos, resíduos e derivados de petróleo e carvão (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, PAHs).

Acompanhando a rota destes contaminantes, observa-se que o ambiente hídrico é o destino final, seja em seu estado bruto, seus derivados ou pela ação indireta. Sendo assim, a água é um recurso em grande perigo. Além de sua escassez e necessidade para manutenção da vida, é no ambiente aquático que se acumulam os resíduos da ação antrópica.

Por estes motivos, grande parte dos programas de monitoramento ambiental têm por base ambientes aquáticos e os organismos que ali vivem. Métodos físicos e químicos são usados e recorrem a equipamentos como ICP-AES (Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) e GC-MS (Gás Chromatografy - Mass Spectrometry). Apesar da grande sensibilidade aos químicos considerados, estes equipamentos não identificam substâncias tóxicas desconhecidas, considerando em suas análises somente aquelas

listadas em seus bancos de dados. A biodisponibilidade dos contaminantes também não é considerada em testes físicos e químicos (WAH CHU e CHOW, 2002). Os bioensaios são relevantes nesse ponto, pois ao expor organismos a substâncias tóxicas, desconhecidas ou não, estes apresentarão alguma resposta à toxicidade, criando o conceito de bioindicadores, que são organismos que devem preencher alguns requisitos, como sensibilidade aos contaminantes, capacidade em metabolizar ou acumulá-los, sendo as modificações que ocorrem nestes utilizadas como biomarcadores, possibilitando a quantificação dos contaminantes e seus efeitos.

Segundo Walker (1996), biomarcadores são definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente. São considerados uma ferramenta indispensável para programas de monitoramento, pois apresentam grande susceptibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN *et al.*, 1992). A análise desses parâmetros permite a detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, identificação de espécies e populações em risco de contaminação, magnitude da contaminação e determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos compostos xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992). Tendo conhecimento dos mecanismos que envolvem os biomarcadores e os contaminantes, é possível extrapolar os resultados, aplicando-os aos Homens e demais organismos.

O uso de organismos como pequenos e médios mamíferos, aves e peixes como bioindicadores é favorável pela proximidade filogenética com humanos, mas implica em algumas complicações, como o ciclo de vida longo, a manutenção destes animais em cativeiro e o número utilizado para ser aceitável estatisticamente. Considerando essas limitações, entre outras, surge a idéia de substituir peixes e pequenos mamíferos por invertebrados, especialmente nos estudos que visam elucidar os mecanismos celulares ou subcelulares de ação de contaminantes. Lagadic e Caquet (1998) discorreram sobre as vantagens e desvantagens de se trabalhar com invertebrados em ensaios toxicológicos. Além de serem de fácil manipulação, a quantidade de animais utilizados pode ser aumentada, pois possuem ciclo de vida curto o que implica em alta fertilidade, maturação sexual precoce e grande número de descendentes, quando em condições favoráveis. O número de replicatas ou de doses a serem testadas pode ser aumentado, assim como a significância

estatística do ensaio sem o aumento do custo. A quantidade de contaminantes utilizada é menor, reduzindo a quantidade de material contaminado e de resíduos produzidos. Assim, os resultados são atingidos rapidamente, o que permite o trabalho com mais de uma geração. A escolha de espécies com reprodução partenogenética (*Daphnia magna*) (WAH CHU, 2002; LAGADIC e CAQUET, 1998) ou hermafroditas (*Caenorhabditis elegans*) (URA et al, 2002; POWER e POMERAI, 1999; BRENNER, 1974) representa outro facilitador. A reprodução assexuada descarta a necessidade da separação dos indivíduos pelo sexo para que ocorra reprodução e permite gerações sucessivas com caracteres semelhantes, evitando grandes variações dentro da população trabalhada. E, mesmo com grande homogeneidade genética, as variações dentro das próprias linhagens possibilitam o estudo dos processos de transmissão de caracteres e suas origens. Considerando que os organismos mantêm certas características genéticas durante a evolução, como estruturas de proteínas e enzimas, estas podem ser estudadas em invertebrados e os resultados extrapolados para outros organismos, mesmo aqueles não pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. Mais uma vantagem a ser citada engloba uma visão ecológica, pois estes organismos ocupam posições na cadeia alimentar do ambiente aquático ou terrestre, interferindo em todo um processo. Informações ecológicas mais apuradas podem ser obtidas incluindo matrizes do sistema a ser testado (<sup>1</sup>STEINBERG C.E.W, GEYER H.J, KETTRUP A.A.F., 1994. *apud* LAGADIC e CAQUET, 1998) e utilizando organismos específicos para as moléculas a serem testadas (i.e. invertebrados filtradores ou de sedimento).

O "Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity program" testou 50 contaminantes em linhagens celulares, bactérias, plantas, peixes e três espécies de invertebrados, demonstrando que testes de toxicidade com invertebrados são promissoras ferramentas de monitoramento toxicológico para humanos (<sup>2</sup>CALLEJA, MC, PERSOONE G, GELADI P., 1994 *apud* LAGADIC e CAQUET, 1998).

---

<sup>1</sup>STEINBERG, CEW.; GEYER, HJ.; KETTRUP, AAF. Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere*. v. 28, p.357-374, 1994.

<sup>2</sup> CALLEJA, MC; PERSOONE, G.; GELADI, P. Human acute toxicity prediction of the first 50 MEIC chemicals by a battery of ecotoxicological tests and physicochemical properties. *Food Chem Toxicol*. V. 32, p.173-187. 1994.



## 1.1.Nematóides

Os nematóides, popularmente chamados de vermes, são conhecidos e estudados principalmente por serem causadores de doenças. No Egito antigo havia registros de doenças causadas pelos “hookworms”; Ascaris foi citado por Aristóteles e anciãos chineses, e árabes estudaram a elefantíase durante a Idade das Trevas. Lineau classificou-os na classe Vermes, a qual mais tarde passou a ser o Filo Nematoda. Apesar da atenção a este grupo voltar-se aos parasitas, compreende ainda representantes de vida livre, aquáticos e terrícolas. (SCHMIDT, G.D. e ROBERTS, 1996)

As espécies deste filo caracterizam-se pelo aspecto cilíndrico e de simetria bilateral. Possuem sistema digestivo completo, com a boca anterior e o ânus posterior, próximo à extremidade final do corpo. O sistema reprodutivo da fêmea termina em um poro genital e o do macho, numa cloaca. A maioria de suas espécies é díóica, com dimorfismo sexual, podendo apresentar hermafroditismo. Podem ser ovíparos ou ovovivíparos e seu desenvolvimento passa por “mudas” até chegar ao estágio adulto, sexualmente maduro.

O corpo é revestido por uma cutícula acelular secretada pela hipoderme e os músculos da parede do corpo formam uma camada unicelular. Possuem o sistema nervoso arranjado em um anel circunfaringeano.

Os nematóides são bons modelos biológicos pela sua dinâmica populacional, além de superar outros invertebrados pelo fato de não serem sazonais, ou seja, estarem disponíveis o ano inteiro. A semelhança entre os organismos desse grupo possibilita comparações e substituições. Em estudo sobre extratos vegetais nematicidas para determinada espécie parasita foi utilizado uma espécie de vida livre (Panagrellus redivivus), dispensando o cultivo de plantas infectadas (CUNHA e CAMPOS, 2003).

São diversos os xenobiontes utilizados em bioensaios com nematóides e cada vez mais amplos os aspectos considerados nestes estudos. Acrobeloides sp. e Aphelencus sp. foram testados quanto à sensibilidade aguda na presença cobre e benzopireno, considerando mudanças em sobrevivência (LC<sub>50</sub>), tamanho e reprodução (LI *et al*, *in press*). Receptores de hormônios são afetados por inseticidas em Panagrellus redivivus, afetando a fecundidade (HOOD, CALABRESE e ZUCKERMAN, 2000). As respostas aos xenobiontes obtidas com nematóides, em relação aos mamíferos, têm sido comparadas na presença de metais (DUSENBERY *et al*, 1975 e LI, *in press*), organofosforados

(HILLIARD & BARGMAN, 2002) e anestésicos voláteis (<sup>3</sup>ANTON *et al.*, 1992 *apud* COLE, 2004), além do uso de biomarcadores freqüentemente utilizados, como a ação e expressão da metalotioneína (DALLINGER, 1996; SWAIN *et al.*, 2004) e CYP450 (MENZEL *et al.*, 2001) e, uma outra alternativa, a avaliação da quimiotaxia ((HILLIARD & BARGMANN, 2002; TAJIMA *et al.*, 2003; MATSUURA *et al.*, 2004).

### 1.1.1 *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um nematóide de vida livre, de ambiente temperado, terrícola, podendo ser encontrado em pequenas poças, próximo a rios e lagos. O adulto chega a 1,5 mm de comprimento, alimenta-se de microorganismos, principalmente bactérias. Movimenta-se na superfície da placa de ágar por ondas sinusiais e “tombado” sobre o substrato para o lado direito do corpo. Aparentemente não exalam nenhum cheiro característico e são quase translúcidos (HOPE, 1999).

Possui 929 células somáticas, sendo aproximadamente 300 neurônios. As fêmeas apresentam 30% de células sexuais e os machos 40%. Em um espaço restrito é possível manter vários organismos (HOPE, 1999). É de fácil manipulação e de ciclo de vida curto. Uma nova geração desenvolve-se em 3 dias em meio a 20°C, e cada adulto produz cerca de 300 descendentes. Possuem representantes machos e fêmeas, sendo as “fêmeas hermafroditas”, isto é, os indivíduos hermafroditas produzem óvulos e espermatozóides. Os machos, são menores, mais delgados e em menor número numa população. Normalmente o *C. elegans* propaga-se por autofecundação, mas, com a presença do macho que produz somente espermatozóides, há possibilidade de troca de material genético (fecundação cruzada), gerando uma população na proporção sexual de 1:1. São diplóides, possuem cerca de 17.800 genes e genotipicamente representados por 5AA + XX e 5AA + XO, hermafroditas e machos respectivamente (BRENNER, 1973).

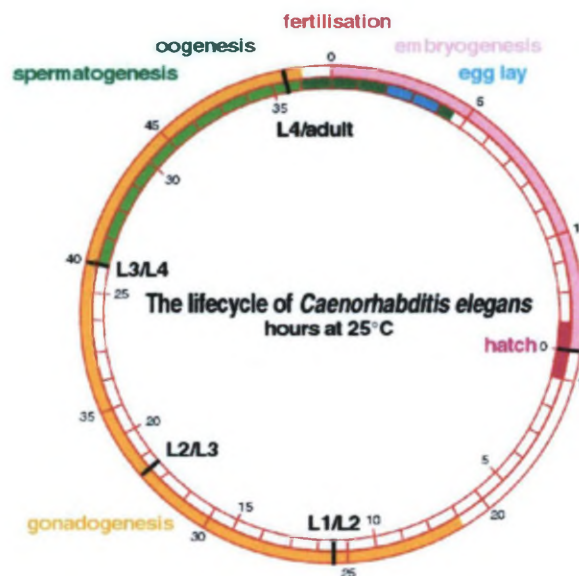
A larva recém-eclodida assemelha-se muito com o adulto e diferenciada somente pela formação gonadal e comprimento (SULSTON & HORVITZ, 1977), assim como os demais estágios larvais, de L1 a L3. No estágio L4 sua distinção é feita pela formação da vulva e o estágio adulto pela presença de

---

<sup>3</sup> ANTON, A.H., BERK, A.I., NICHOLLS, C.H.,. The “Anesthetic” effect of alcohols and alkanes in *Caenorhabditis elegans* (C.e.). *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* V.78, p. 69– 83. 1992

ovos no interior da fêmea (WINTER, comunicação pessoal). Ao fim de cada estágio a larva produz uma nova cutícula, excretada pela hipoderme, uma combinação de proteínas e carboidratos sobre a hipoderme. O corpo é translúcido, facilitando sua visualização (HOPE, 1999).

### Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*



Fonte: [http://nema.cap.ed.ac.uk/Caenorhabditis/C\\_elegans.html](http://nema.cap.ed.ac.uk/Caenorhabditis/C_elegans.html). Captado em 05/12/2004

Figura 1: esquema ilustrativo do ciclo de vida do *C. elegans*

Para atingir a vida adulta a partir do ovo, ou seja, ser capaz de se reproduzir, são dois dias a 25°C e seis dias a 15°C. Em condições ideais, sua vida varia de 12 a 18 dias em 20°C. Desenvolve-se sobre placa de Petri contendo ágar enriquecido com colesterol e uma camada de *E. coli*. Na ausência de alimento, entra numa forma mais resistente e não obrigatória, passando do estágio L2 para *dauer*. Esta larva é do comprimento de uma larva L3, mas mais delgada. Este estágio é mais resistente a condições, como dessecação, a própria falta de alimento (HOPE, 1999) e substâncias de caráter agressivo como NaCl, guanidina, gluteraldeído, SDS, vários detergentes e anestésicos (CASSADA & RUSSEL, 1975). Sua morfologia é alterada, sua aparência interna torna-se mais escura e, o que seria o trato digestivo, é fechado. A densidade do corpo aumenta, provavelmente pela perda de lipídios e água. Outra estrutura modificada é a cutícula, com a adição de uma camada estriada, semelhante a nematóides parasitos. Sobrevivem melhor a 15°C e

melhor a 15°C e 25°C, temperaturas que dificilmente suportariam nos demais estágios larvais. A movimentação diminui, quase a um ritmo letárgico e, quando se movimentam, são um pouco mais rápidas que uma L3. O bombeamento da faringe é suspenso, retornando ao ritmo normal ao passar para o estágio de L4. Respondem a estímulos químicos e físicos imediatamente. Somente na forma *dauer* o *C. elegans* é capaz de projetar seu corpo acima da superfície do ágar, característica provavelmente desenvolvida em seu ambiente natural, como uma forma de se movimentar prendendo-se a organismos maiores. O tempo de vida da *dauer* pode estender-se por meses e, com a adição de alimento (bactéria), retornam ao ciclo de vida, tornando-se larvas L4 e assim sucessivamente (CASSADA & RUSSEL, 1975).

No adulto, o macho e a fêmea são diferenciados por algumas características morfológicas. O ânus da fêmea e a cloaca do macho são ventrais na região posterior, próximo à extremidade. O macho possui espículas próximas à cloaca, e a vulva da fêmea situa-se entre a região mediana e posterior ventral. Os sexos diferem na cauda e organização gonadal. Ambas as gônadas são tubulares, a da fêmea ocupando uma região proporcionalmente maior que no do macho. Não há flagelos nos gametas masculinos.

Seu sistema nervoso é capaz de distinguir cheiro, gosto, temperatura, toque e, mesmo não possuindo olhos, responde à luz. Os machos possuem 383 células nervosas, sendo 89 sexo-específicos, e as fêmeas 302 células nervosas que formam um anel circunfaringeano no cordão nervoso ventral e na cauda, destes, 8 sexo-específicos (SULSTON & HORVITZ, 1977). Possui glândulas sensoriais na cabeça e cauda, sendo a quimiorrecepção uma das formas de analisar sua resposta diante de xenobiontes (COLE, *et al*, 2004) e fármacos (TAJIMA *et al*, 2000).

Descrito por Maupas em 1900, *Caenorhabdits elegans* tornou-se o modelo biológico utilizado por Sydney Brenner a partir de 1966. Este nematóide tem sido utilizado principalmente para estudos genéticos, com o término da descrição de seu genoma em 1998. Em 2002, Brenner, em conjunto com John Sulston, Robert Horvitz e sua equipe, receberam o Prêmio Nobel pela identificação dos genes de desenvolvimento de órgãos e a programação da morte celular usando o *C. elegans*.

Em 1973 Brenner relatou mutantes resultantes da ação do etil metanosulfonato (EMS), descrevendo os genes alterados e suas características fenotípicas resultantes, estabelecendo protocolos de

manutenção de cultura, caracterização de mutantes, cruzamentos, estabelecimento de linhagens. Este trabalho serve como base dos estudos genéticos do *C. elegans* até hoje.

Também demonstraram a correspondência dos genes do *C. elegans* em outros organismos, incluindo o homem. Foram identificados 80 genes para CYP450, sendo que estes respondem a indutores de CYP450 conhecidos para mamíferos e microorganismos, possibilitando uma comparação entre esses organismos (MENZEL *et al*, 2001). Outros genes humanos possuem homólogos em *C. elegans* (JOHNSON, 1989; RAND, 1995; <sup>4</sup>CULETTO, 2000 *apud* MENZEL *et al*, 2001) possibilitando o desenvolvimento de drogas.

O *C. elegans* foi objeto de estudos embriológicos (SULSTON & HORVITZ, 1983) e, mais recentemente, passou a integrar os organismos que se prestam a estudos toxicológicos. Ura (2002) demonstrou a sensibilidade do verme na presença de diversos contaminante, entre eles inseticidas, organoclorados, policíclicos aromáticos, solventes e cádmio.

O *stress* ambiental pode ser mensurado através das *heat shock proteins* (HSPs) e seus fatores de transcrição (HSTF), ativados em caso de elevados índices de *stress* celular. A expressão dos genes *hsp* é de leitura rápida e indica doses sub-letais causados por injúrias ambientais. A manipulação genética do *C. elegans* possibilita a detecção da expressão desta proteína de maneira específica, em conjunto com o promotor da metalotioneína *mtl-2*. Essa linhagem é induzida por alguns metais pesados e não por todo tipo de *stress* ambiental, além da sensibilidade reduzida, entre 10-100µM de um único metal (<sup>5</sup>CIOCI *et al.*, 2000 *apud* WAH CHU, 2002).

A transcrição da vitelogenina é uma forma de medir a ação de poluentes como policíclicos aromáticos e metais pesados, usado em peixes, mamíferos, crustáceos (GEORGE *et al*, 2004; MARTIN-DIAZ *et al*, 2004) e *C. elegans*, que mostrou maior sensibilidade ao 17beta-bisfenol, BPA (bisfenol A) e TBT que culturas de hepatócitos de carpa e indução de *impossex* no gastrópoda *Hinia reticulata*, respectivamente (HOSHI *et al*, 2003). Oito entre 15 organosforados testados foram considerados tóxicos ao ser medida a atividade anticolinesterásica, sendo seis desses oito compostos já conhecidos como inibidores de colinesterase em maníferos (COLLE *et al*, 2004).

<sup>4</sup> CULETTO, E.; SATTELLE, D.B. *Hum. Mol. Genet.* V.9, p.869-877, 2000.

<sup>5</sup> CIOCI, L.; QUI, L.; FREEDMAN, J.H. Transgenic strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* as biomonitors of environmental contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* V. 19, p.2122-2129, 2000.

Além das vantagens biológicas em se usar o C. elegans como modelo, está a facilidade de se encontram informações. Com a mesma ideologia que a *Drosophila Information Service*, um jornal específico para atender a necessidade de troca de informações entre os pesquisadores de Drosophila melanogaster, a *Worm Breeder's Gazette* surgiu em dezembro de 1975, possibilitando a livre troca de informações e materiais entre a "comunidade C. elegans", e atualmente disponível *on-line* (<http://ou.edu/journals/dis/>). Com o avanço das pesquisas e o início do seqüenciamento do genoma do C. elegans, uma outra ferramenta disponível a esses pesquisadores foi criada, o CONTIG9, que ajudou a montar o mapa genômico. A partir deste, em 1992, Thierry-Mieg e Durbin desenvolveram o ACeDB (A C. elegans Database), expandindo a quantidade de informações disponíveis, como linhagens celulares e seu desenvolvimento, padrões de expressão gênica, estrutura de enzimas e proteínas, os laboratórios de pesquisa e artigos publicados no *Worm Breeder's Gazette* (HOPE, 1999). Estes programas, em conjunto com outros, formam hoje o *WormBase* (<http://www.wormbase.org>), de livre acesso na *internet*, complementando as informações genéticas do animal com busca por genes, clones, publicações, fórum de discussão e informações atualizadas. Outros *links* são citados, como o *WormAtlas* (<http://www.wormatlas.org>), com atlas morfológico (*Handbook*), identificação de células e protocolos (WINTER, *in press*). Complementando a rede de informações, a Universidade de Minnesota abriga o Caenorhabditis Genetic Center, o CGC, responsável pela coleta, manutenção e distribuição gratuita de C. Elegans, incluindo clones e mutantes, material bibliográfico, publicação e distribuição do *Worm Breeder's Gazette*.

Outros invertebrados têm sido utilizados em estudos ambientais, como Turbatrix aceti (verme-do-vinagre) e o Panagrellus redivivus (SAMOILOFF, 1987), Limulus polyphemus, Ceriodaphnia dubia (LAGADIC e CAQUET, 1998) entre vários outros.

Turbatrix aceti e Panagrellu redivivus, assim como o C. elegans, são nematóides de vida livre e biologicamente semelhantes. A criação destes é difundida entre criadores de peixes como alimento vivo para aquários. T. aceti desenvolve-se naturalmente em vegetais em fermentação, como maçãs em decomposição, sendo cultivado em meio de 50% a 80% de vinagre. É de importância econômica pois pode ser uma praga na indústria de vinagre. P. redivivus é mantido em aveia e difere do C. elegans e T. aceti pela reprodução ovovivípara e reprodução cruzada (HOOD *et al*, 2000). Possui

aproximadamente 530 células somáticas, passa por 5 estágios larvários em até 96 horas (NAHYR & DIAZ, *on line*). Os três vermes assemelham-se quanto a morfologia geral, possuem hermafroditas e machos em suas populações, sendo as fêmeas em maior número e tamanho. Movimentam-se dorso-ventralmente e, apesar de desenvolverem em substrato sólido, C. elegans e P. redivivus podem ser mantidos em meio líquido (CHITWOOD *et al*, 1987).

Pouco tem-se feito com o P. redivivus e I. aceti como modelos biológicos, pouco se sabe da genética e bioquímica destes como se sabe de C. Elegans, mas ambos vêm se popularizando, sendo utilizados em conjunto com o C. elegans (SULSTON *et al*, 1983; CHITWOOD *et al*, 1986; ACHAZI, 2000), e sozinhos, como o Panagrellus redivivus (HOOD *et al*, 2000; CUNHA *et al*, 2003).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral:

- Estabelecer o cultivo dos nematóides Caenorhabditis elegans, Turbatrix aceti e Panagrellus redivivus e avaliar os efeitos do Pb sobre essas espécies.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Definir as condições ideais para o desenvolvimento e reprodução das espécies de nematóides Caenorhabditis elegans, Turbatrix aceti e Panagrellus redivivus;
- Avaliar os nematóides Panagrellus redivivus, Caenorhabditis elegans e Turbatrix aceti como bioindicadores para metais pesados após 24 h de exposição ao nitrato de chumbo.
- Observar e avaliar os efeitos celulares e histológicos em microscópio óptico.



### 3. Materiais e métodos

Todos os procedimentos foram realizados no Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná. Os experimentos e manutenção dos meios de cultivo centraram-se no Laboratório de Toxicologia Celular e no Laboratório de Biologia de Fungos, tendo como responsáveis o Prof. Marco A. F. Randi e Profa. Dra. Ruth J. G. Schadeck, respectivamente. Alguns itens para manutenção das culturas de *E. coli* foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Depto. de Patologia da UFPR.

#### 3.1. *Caenorhabditis elegans*

A partir de placas contendo *C. elegans* N2 e *E. coli* NA22, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos E. Winter, do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, as culturas de *C. elegans* foram realizadas com base no trabalho de Brenner (1974), e as culturas de *E. coli* de acordo com protocolos usuais de microbiologia.

Amostras das culturas de *E. coli* NA22 foram repicadas das primeiras culturas com o uso de alça de microbiologia em condições estéreis (em fluxo laminar, na presença de bico de Bunsen) para placas de Petri descartáveis e estéreis de 9 cm de diâmetro, previamente preparadas com ágar-peptona, lacradas com Parafilm<sup>(r)</sup>. Foram mantidas aproximadamente 24 horas em estufa a 26°C para que a cultura crescesse. Verificando-se o crescimento da cultura, as placas foram transferidas e mantidas em geladeira 4°C, invertidas, para evitar contaminações e acúmulo de água, e seu isolamento reforçado com filme plástico. Este procedimento foi repetido a cada 15 dias (repique), embora possam ser mantidas em bom estado de uso por até 4 meses. As placas foram preparadas com ágar-peptona autoclavado (15 g de ágar, 10 g de peptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 1L de água destilada) e plaqueadas no mesmo dia. Foram mantidas fechadas em sacos plásticos estéreis, invertidas e dentro do fluxo laminar até serem inseminadas. (Obs.: aconselha-se esperar até três dias para utilizar as placas, assim tornam-se evidentes possíveis contaminações com fungos e/ou outras bactérias.) O prazo máximo observado para utilização destas placas, a partir do plaqueamento, foi de 15 dias. Após este período as placas apresentaram contaminação por fungos.

A partir destas culturas em meio sólido de E. coli, foram feitas culturas em meio líquido, usadas para a manutenção dos exemplares de C. elegans. O meio líquido (10g de peptona, 5 g de extrato de carne, 10 g de NaCl, diluído em 1L de água destilada e autolavado) pode ser feito em quantidades maiores, pois é separado em alíquotas de 3 mL e mantido em geladeira (4°C) até o momento do uso. Um dia antes do uso, com a alça de microbiologia, o meio líquido é inoculado a partir de uma colônia de uma placa de Petri de E. coli. Após o período de 8 a 24 horas em estufa 26°C apresenta um aspecto turvo, indicando o aumento da quantidade de bactérias. Este meio foi utilizado para “alimentar” os vermes C. elegans.

O ágar NGM (*Nematode Growth Medium*) também foi preparado com antecedência e armazenado, até o uso como as placas de ágar peptona. Este ágar foi preparado com a adição de 3 g de NaCl mais 15 g de peptona, 1 mL da solução de 5 mg/L colesterol em etanol, 17 g de ágar diluídos em 975 mL de água destilada. Esta solução foi autoclavada e depois acrescida de 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  1M, 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  1M e 25 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M em condições estéreis e então distribuída em placas de Petri de 9 cm ou 6 cm. Após no mínimo um dia do plaqueamento, as placas são inoculadas com 0,3 ou 0,2 mL do meio líquido de E. coli, de acordo com o tamanho da placa, preenchendo até 2/3 da placa com o meio. (Obs.: ao adicionar o meio líquido deve-se evitar encostar nas paredes da placa, pois assim os vermes poderão “escalar” e dificultar seu manuseio). Mais 24 h em estufa a 26°C permite que se estabeleça uma camada de bactérias na placa sobre o ágar. Este meio permite que não se alastrem colônias de bactérias pelo NGM, pois é um meio pobre para a E. coli. Assim, vermes e bactérias não disputam nutrientes nem espaço físico.

Os vermes foram transferidos para as novas placas de duas formas: por transferência de pedaços de ágar e com o uso de alça ou estilete. Esses dois métodos foram realizados em fluxo laminar e com temperatura apropriada. Previamente observou-se a placa doadora sob lupa e a região com maior número de indivíduos foi demarcada; com um bisturi, a região foi cortada e transferida para a nova placa já contendo a camada de bactérias. A segunda opção foi transferir individualmente os vermes com um estilete, espátula ou alça. Foram utilizados estiletes odontológicos com a extremidade esterilizada no fogo, após ser molhada em álcool. O estilete foi então resfriado numa região da placa nova sem bactérias e encostado na camada de E. coli desta mesma placa ou de uma terceira que fosse destinada somente a esta finalidade. Assim

os vermes aderem mais facilmente ao estilete, o qual foi encostado na região marcada da placa velha, fazendo com que os vermes adiram às bactérias e, ao encostar o estilete numa região limpa da nova placa, estes são transferidos. Sob a lupa verificou-se se houve a transferência, bem como o estado dos vermes. As placas foram lacradas com Parafilm<sup>(r)</sup> e guardadas em uma caixa de isopor para manter umidade e uma temperatura estável ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). O repique do *C. elegans* foi feito a cada 3 dias.

### 3.1.2. Cultura Sincronizada (Willians and Dusenbery, 1988 in Tartara, 1998)

Para obtenção de cultura sincronizada de *C. elegans*, os ovos foram isolados dos adultos com o uso de hipoclorito de sódio. Uma placa de Petri com grande número indivíduos adultos foi lavada com uma solução recém preparada de hipoclorito de sódio a 1% (água sanitária 2%-2,5% diluída 50% em água deionizada) mais 10 g/L de NaOH. Para uma placa de 6mm foi utilizada 0,5 mL desta solução mais o mesmo volume de meio K (2,36 g KCl + 3,0 g de NaCl por litro de água deionizada). Com micropipeta, cerca de 0,5 mL do lavado foi acondicionado em tubo *Eppendorf* de 1,5 mL e agitado para destruir adultos e assim liberar ovos no meio. As larvas e os adultos morrem sobre a ação do hipoclorito, enquanto que os ovos resistem. Os *Eppendorfs* foram então centrifugados de 1 a 3 minutos, até a formação de *pellet*. A ressuspensão do *pellet* é feita em 0,2 mL de meio K e a centrifugação e ressuspensão foram repetidas por mais duas vezes. Na última ressuspensão, a quantidade de meio foi reduzida de acordo com o volume do *pellet* (de 0,05 a 0,02 mL). Em fluxo laminar, o conteúdo dos *Eppendorfs* foi transferido para placas novas de NGM sem *E. coli* próximo à borda da placa. Em três dias os ovos eclodem e as larvas migram pela placa. Assim que boa quantidade de ovos tenham eclodido, a região onde foi inseminado foi cortada e retirada com o auxílio de bisturi, evitando assim novas contaminações com possíveis resquícios de esporos ou outras bactérias. As larvas devem se manter em estágio L1 até serem adicionadas bactérias.

A partir da forma *dauer* é possível obter uma população sincronizada, pois permanecem neste estado na ausência de bactéria. Ao serem adicionadas bactérias, estas larvas continuam seu desenvolvimento chegando então à forma adulta em dois ou três dias.

### **3.2. Turbatrix aceti**

Os exemplares de Turbatrix aceti foram cedidos pelo Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Foram mantidos em 80% de vinagre de vinho comercial diluído em água destilada em frascos de vidro vedados com gaze em temperatura ambiente, sem condições especiais de iluminação ou aeração.

### **3.3. Panagrellus redivivus**

O inóculo de Panagrellus redivivus foi cedido pelo Prof. Dr. Carlos E. Winter. Foram mantidos em meio de aveia Quaker<sup>(r)</sup> acrescido de água destilada, ambos estéreis, em frascos de vidro com tampa parcialmente rosqueada em temperatura ambiente. Não foram tomados cuidados específicos com aeração, iluminação e temperatura. De acordo com o Prof. Winter, outras marcas de aveia são mais susceptíveis a contaminações por fungos e bactérias. Uma cultura grande e três pequenas foram mantidas.

### **3.4. Preparação de Lâminas**

Vários protocolos indicados *on-line* (i.e. *Wormbase*) e em livros (i.e. C. elegans) indicam o uso de ágar para preparar lâminas para observação dos nematóides. Seguindo orientação pessoal do Prof. Dr. Winter, foi feito com agarose. As duas soluções foram testadas, ágar 5% e agarose 3%. O modo de preparação do *pad*, um disco de ágar ou agarose, foi o mesmo. Uma gota (20 a 50 µl) da solução foi colocada no centro de uma lâmina em cujas extremidades foram postos espaçadores (de duas a três camadas de fita adesiva). Uma segunda lâmina foi posicionada sobre a gota, fazendo com que esta solidifique formando o *pad* na espessura determinada pelos espaçadores. Esta lâmina foi retirada delicadamente e os vermes depositados sobre o *pad*. Para anestesiá-los, foram adicionados cerca de 5 µl de Azida 10 mM (HOPE, 1999; *Wormbase*). A coloração para microscopia de fluorescência foi feita a partir da adição de 10 µl de DAPI (4' -6-diamidino-2-fenilindol) 300 nM por 20 minutos. Este corante é específico para ácidos nucleicos, marcando o núcleo celular. Outro procedimento utilizado para preparação de lâminas, foi com a substituição da Azida por AFA (85 mL de etanol 70%, 10 mL de formol 40% e 5mL de ácido acético glacial). Este fixador foi aplicado sobre os nematóides já em lâmina, sobre placa de aquecimento. Assim os vermes foram fixados

estendidos. Neste procedimento foi utilizada a mesma quantidade de DAPI que o procedimento anterior. Os organismos foram observados em microscópio de fluorescência Zeiss Axyophot. As três espécies foram montadas pelo mesmo procedimento.

### 3.5. Contaminação

Para a contaminação com agentes tóxicos foram utilizadas placas de cultivo celular com 24 poços. Extrapolando-se o valor de  $LC_{50}$  (lethal concentration) encontrado por Tartara (1997) de 0,26 mM de  $Pb(NO_3)_2$ , através de uma razão logarítmica outras duas concentrações de chumbo foram usadas numa primeira bateria de testes, 2,6 mM e 0,026 mM. Numa segunda bateria de testes, realizada somente com *C. elegans*, baseado em Wah Chu (2002), outras concentrações foram determinadas, assim como nos primeiros testes, chegando às concentrações de 1,25 mM, 0,125 mM e 0,0125 mM de chumbo e, uma última concentração de 0,0395 mM. Cada grupo contaminado foi testado em três ou seis replicatas. O contaminante foi diluído em meio K (TARTARA *et al* 1997; POWER & POMERAI, 1999; WAH CHU & CHOW,, 2002; COLE *et al*, 2004) pois verificou-se que em meio M9 e meio S (URA *et al*, 2002) o chumbo precipita, impossibilitando a solubilização e possivelmente a disponibilidade do xenobionte para o verme. O grupo controle foi mantido somente em meio K. Em cada poço foram acondicionados de aproximadamente 10 indivíduos nos estágios L3, L4 ou adulto, selecionados visualmente sob lupa caracterizados somente pelo tamanho. Todos os ensaios foram realizados em temperatura ambiente, sendo os vermes contados nos tempos 0h e 24h. Esporadicamente outras contagens foram feitas. A transferência da placa para os poços fez-se através de micropipetador com ponteiros de 10µl sob lupa. Para evitar maiores taxas de mortalidade, principalmente no grupo controle, houve a adição de 10µl de *E. coli* para cada poço de *C. elegans* (TARTARA *et al*, 1997).

### 3.6. Métodos Estatísticos

O número de sobreviventes foi comparado entre os grupos contaminados nas três concentrações e o grupo controle e entre as três espécies, em 0h e após 24h de exposição ao chumbo. Foi realizado o teste t com significância de 5%. Cada grupo (contaminado e controle) possuía em média n=10.

## 4. Resultados

Os meios de cultivo utilizados foram eficazes na propagação de animais. O *Panagrellus redivivus* e o *Turbatrix aceti* desenvolveram grandes populações em poucos dias. Visualmente, a cultura de *T. aceti* e a cultura maior de *Panagrellus redivivus* não desenvolveram contaminações por fungos. Duas das culturas menores foram descartadas por terem sido recobertas por micélios. A manutenção destas culturas se fez apenas pelo acréscimo de água e aveia estéreis quando necessário. Ambas culturas (*P. redivivus* e *T. aceti*) foram manuseadas fora de condições estéreis.

O *C. elegans* respondeu bem às condições de cultura, preenchendo as placas com novos indivíduos na maioria dos repiques. Os repiques foram realizados na maioria das vezes pela transferência de pedaços de ágar, garantindo que uma quantidade significativa de animais fosse transferida, enquanto que a transferência de indivíduos apresentou complicações. Por não possuímos a alça de platina, o repique foi realizado com estilete, gancho e espátula odontológicos. Este material é passível de esterilização em autoclave, mas, ao ser passado na chama, escurecem e demoram para esquentar e resfriar. A grande vantagem da platina é seu rápido aquecimento e resfriamento, não danificando o ágar nem os animais. Os instrumentos utilizados danificaram a superfície do ágar, dificultando posteriores manipulações de indivíduos destas placas e aumentando a probabilidade de contaminação. Neste método de repique, as placas passam muito tempo abertas, expostas ao ambiente, também aumentando a possibilidade de contaminação. O uso do bico de Bunsen e a ausência de sistema de refrigeração no laboratório onde se situa o fluxo acarretaram em danos e perda de nematóides devido à alta temperatura. As chances de contaminação e a susceptibilidade à temperatura elevada agravam-se por ser um procedimento demorado.

As tentativas para obtenção de culturas sincronizadas a partir de ovos apresentaram contaminação por fungos. Foram poucos os ovos que eclodiram e a maioria dos indivíduos alojaram-se entre as hifas, dificultando a transferência destes para uma nova placa e disponibilizando poucos indivíduos para o prosseguimento da cultura. Em placas mais antigas os vermes migraram para o interior do ágar, formando galerias que facilitaram a disseminação de outros microorganismos pelo ágar.

A *Escheria coli* apresentou contaminação, sendo necessário um segundo inóculo cedido pelo Prof. Winter para estabilizar novas culturas. O monitoramento foi feito pelas características das colônias, forma, textura e cheiro, e repiques constantes, a cada 15 dias.

As três espécies de nematóides apresentaram sensibilidade do Pb de formas distintas (fig.2). O *C. elegans* mostrou-se mais sensível a concentrações menores. O LC<sub>50</sub> encontra-se entre os dois valores citados em literatura para este metal, abaixo do valor estimado a partir 0,26 mM (TARTARA *et al*, 1997) e 0,125 mM (WAH CHU & CHOW, 2002). Na primeira concentração proposta (0,23mM), o número de sobreviventes atingiu zero em menos de 24h de exposição e, para a segunda concentração, um valor abaixo do citado na bibliografia. Não foi observada a sensibilidade dos estágios larvais diante o Pb e, mesmo na presença do xenobionte, a eclosão de ovos não foi reprimida. O *I. aceti* apresentou maior resistência entre as três espécies testadas. Além da relação de números de sobreviventes, não demonstrou alterações na movimentação durante a exposição, enquanto que o *C. elegans* e *P. redivivus* se movimentavam de forma contorcida em determinadas concentrações.

As análises estatísticas foram realizadas a partir dos dados obtidos com as concentrações de 0,026, 0,26 e 2,6 mM de Pb, pois as demais restringiram-se ao *C. elegans* e foram realizadas em número menor de replicatas. Usou-se o teste t, com significância de 5%.

Para o *C. elegans*, o grupo controle apresentou diferença pouco significativa entre o número de sobreviventes antes e após as 24 h em relação aos expostos a 2,6 e 0,26 mM cujas quantidades de sobrevivência chegaram a zero e próximo de zero respectivamente (fig.3).

A relação entre o número de sobreviventes e a concentração de Pb em *P. redivivus* foi inversa (fig.4). No grupo controle, não houve diferença significativa entre o tempo zero e 24 h, enquanto que nas demais

concentrações houve diferença, o aumento de mortalidade acompanhou o aumento de concentração.

Em *T. aceti* esta relação difere dos anteriores (fig.5). Todos os grupos, exceto o de menor concentração, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Apesar de ser utilizado o mesmo protocolo proposto (*Wormbase*), os nematóides não responderam como o esperado à coloração pelo DAPI. Uma segunda preparação de lâminas foi testada, com o uso de fixação dos vermes por ALFA (formol 40%, ácido acético glacial e etanol 70%) precedendo a exposição ao DAPI e também sem resultados. Poucas imagens foram obtidas, nenhuma satisfatória para a caracterização dos nematóides trabalhados. Enquanto alguns apresentaram massas fluorescentes sem delimitação dos núcleos, outros apresentaram fluorescência fora do organismo e outros sem nenhuma fluorescência (fig. 12 e 13). As melhores imagens obtidas foram de *Panagrellus redivivus* (fig. 6 a 10).

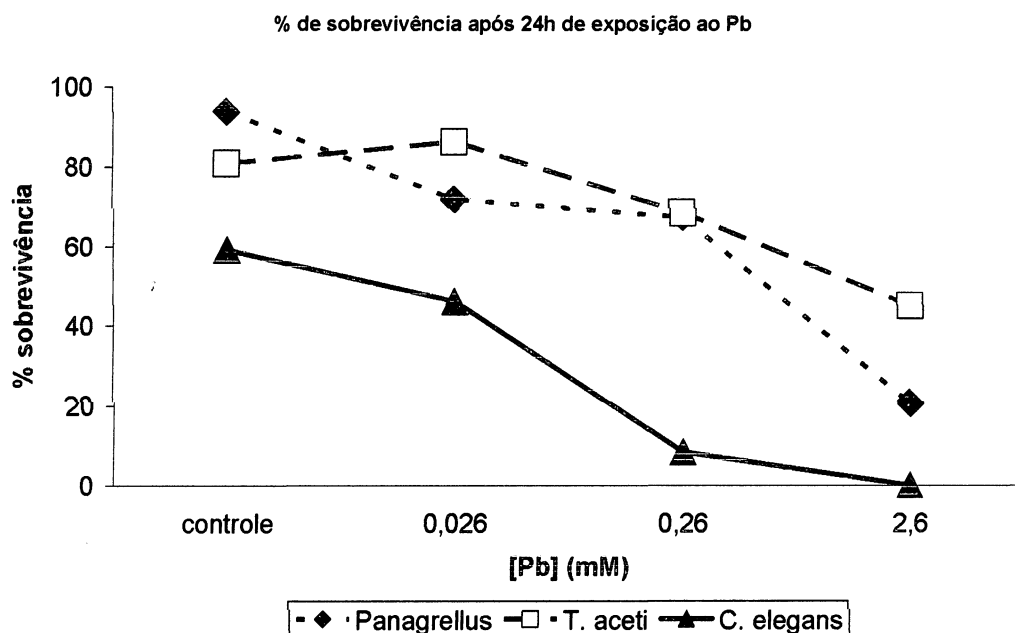


Figura 2 - porcentagem de sobrevivência das espécies *Panagrellus redivivus*, *Turbatrix aceti* e *Caenorhabditis elegans* após 24h de exposição às concentrações de 0,0026 mM, 0,026 mM e 2,6 mM de Pb.



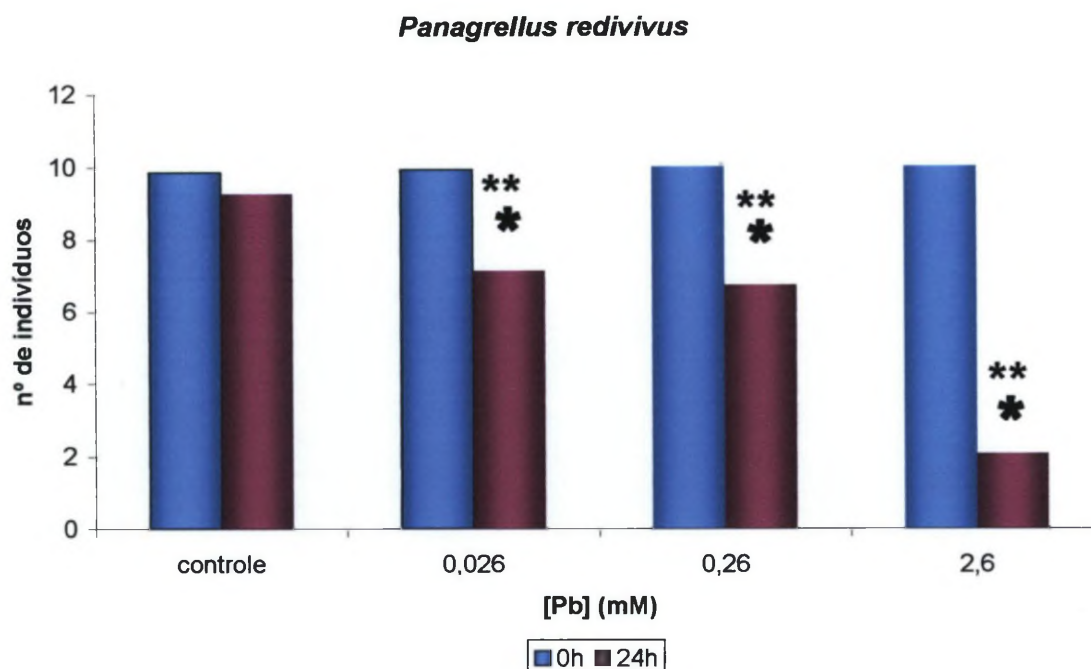


Figura 3 - número de sobreviventes de *Panagrellus redivivus* no grupo controle e contaminados no tempo zero e após 24h de exposição ao chumbo. Média  $\pm$  erro padrão da média de 5 experimentos feitos em triplicata. \* - significativamente diferente em relação ao tempo; \*\* - significativamente diferente em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

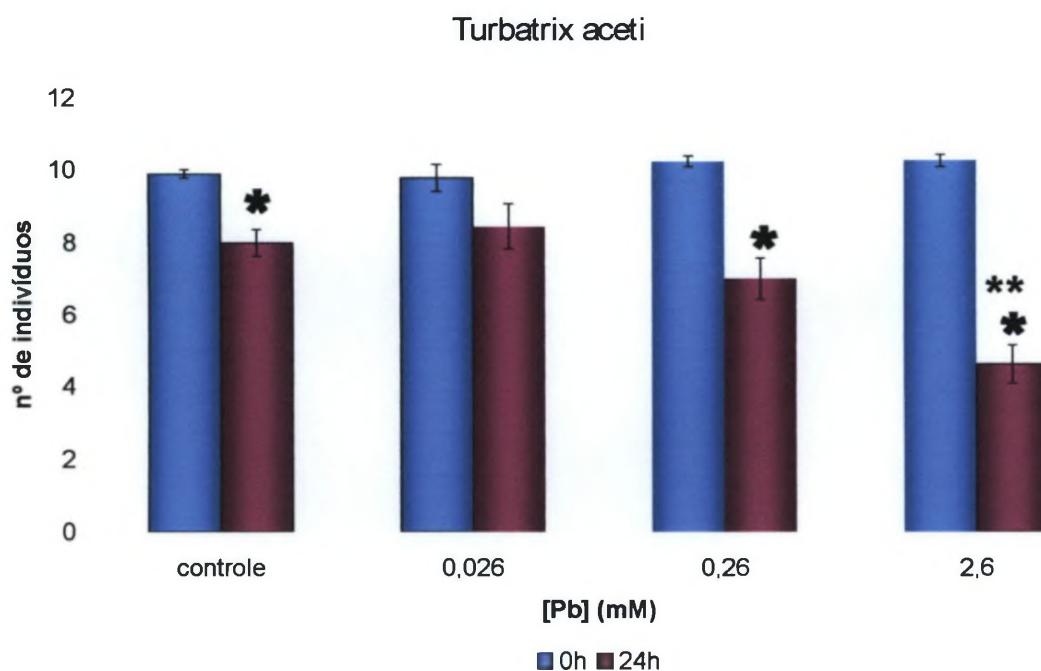


Figura 4 - número de sobreviventes de *Turbatrix acetii* no grupo controle e contaminados, no tempo zero e após 24h de exposição ao chumbo. Média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos feitos em triplicata. \* - significativamente diferente em relação ao tempo; \*\* - significativamente diferente em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

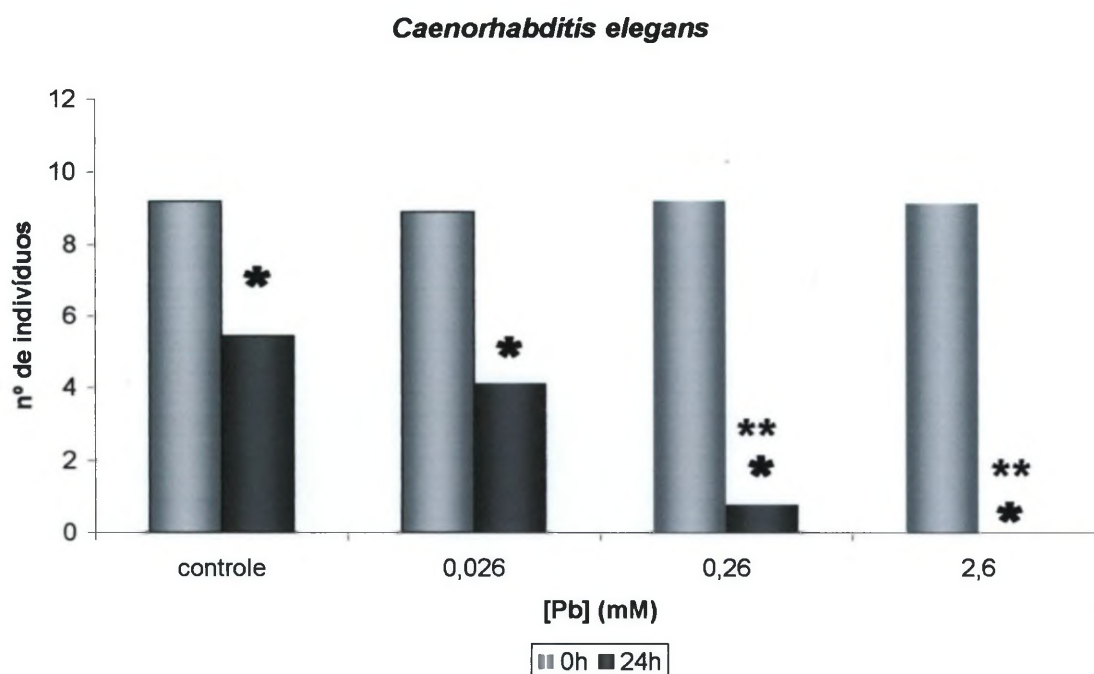
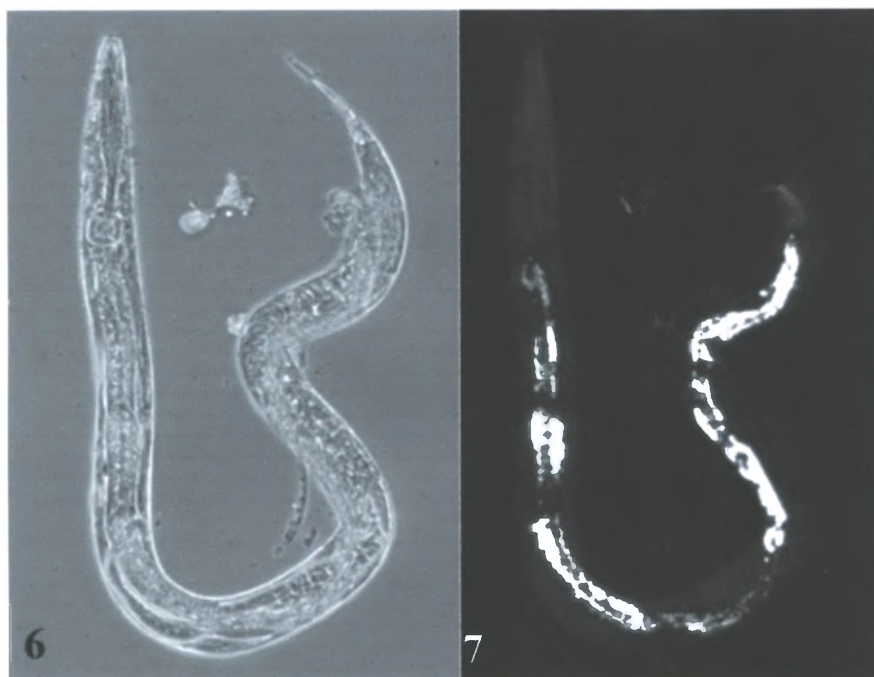
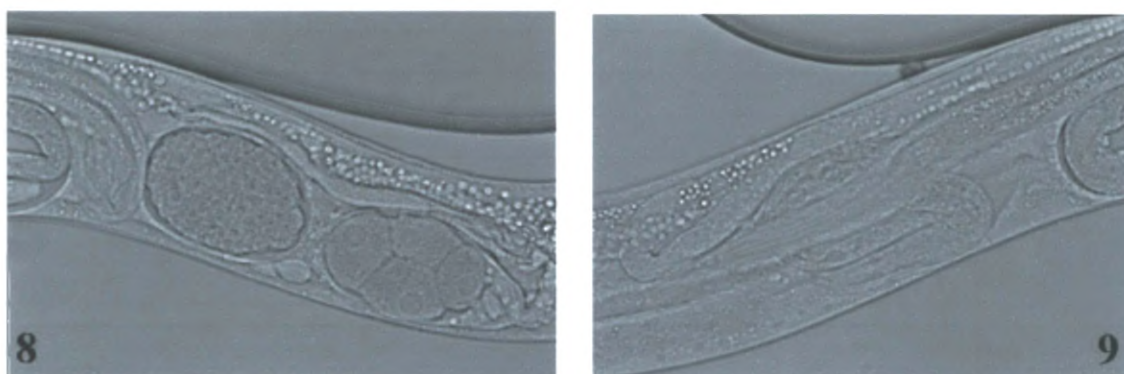


Figura 5 – número de sobreviventes de *Caenorhabditis elegans* no grupo controle e contaminados, no tempo zero e após 24h de exposição ao chumbo. Média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos feitos em triplicata. \* - significativamente diferente em relação ao tempo; \*\* - significativamente diferente em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



Figuras 6 e 7 – vista geral de *P. redivivus* em microscopia de contraste de fase (A) e fluorescência, após coloração com DAPI (B).



Figuras 8 e 9 – interior do hermafrodita do *P. redivivus* com embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (C) e embrião de já formado (D).

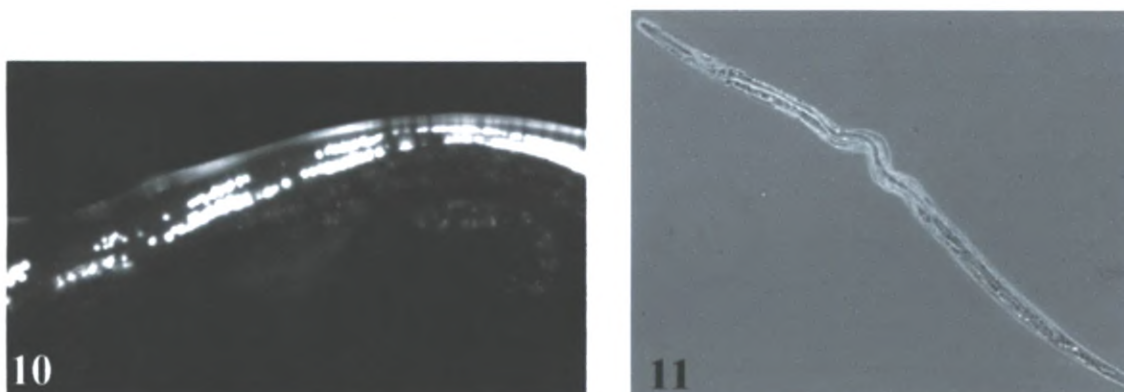
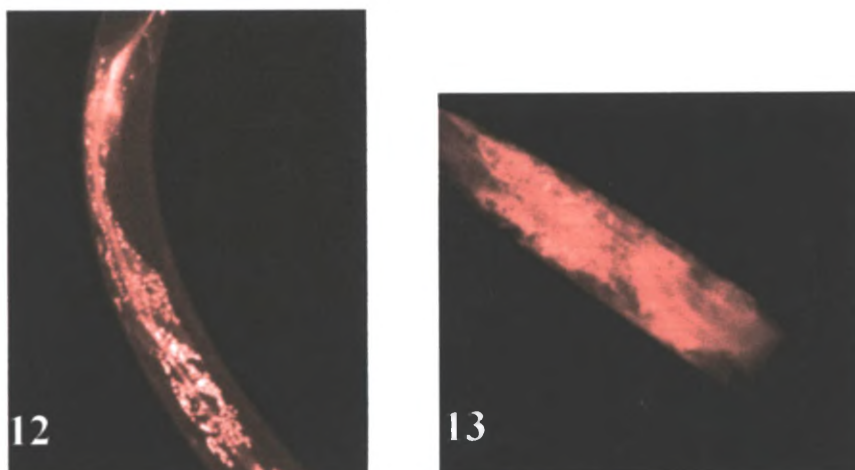


Figura 10 – imagem de *P. redivivus* em microscopia de fluorescência após coloração com DAPI; Figura 11 – imagem em microscopia de contraste de fase de *T. aceti*.



Figuras 12 e 13 – microscopia de fluorescência, após coloração com DAPI, em *C. elegans*, na região mediana de *dauer*. Em G, núcleos visíveis e região com aspecto esfumado. Na figura H, nenhuma delimitação de núcleo, somente o aspecto “esfumado”.

## 5. Discussão

Apesar de preencher vários quesitos para ser considerado um bom modelo biológico, encontramos neste estudo algumas desvantagens durante a manipulação do *C. elegans*. Para que sua manutenção seja fácil, há necessidade de infra-estrutura, como uma sala refrigerada equipada com fluxo laminar, estufas a 36°C e 16°C, geladeira 4°C, freezer -80°C ou nitrogênio líquido, lupas, microscópios e autoclave. Para as condições atuais do Laboratório de Toxicologia Celular o *C. elegans* é um organismo exigente; sua manipulação demanda tempo e cuidados, algumas de suas necessidades (i.e. colesterol) são dispendiosas. Para um laboratório equipado para este fim, após um bom investimento inicial, o *C. elegans* é um bom modelo, pois além de sua manipulação ser facilitada, suas outras características, especialmente o conhecimento acumulado sobre ele, são muito favoráveis a sua implantação como modelo biológico para estudos toxicológicos.

A maioria dos protocolos (*Wormbase*; HOPE, 1995; LEWIS & FLEMING, 1995) descreverem o uso de triptona, entretanto a sua substituição por peptona se mostrou eficaz. A linhagem OP50 não se fez necessária. Esta linhagem é indicada principalmente para trabalhos realizados para caracterização morfológica, critério necessário para a caracterização de mutantes (WINTER, comunicação pessoal). O inóculo de N2 é uma linhagem selvagem e suficiente para o presente trabalho, além de ser a atualmente disponível. Caso seja

necessário, linhagens de *E. coli* para manutenção do *C. elegans* também são cedidas pelo CGC (*Wormbase*).

Os diferentes métodos de exposição nos estudos com *C. elegans*, ou mesmo com outros nematóides, dificultam a comparação de resultados e do bom entendimento dos mecanismos biológicos considerados. A quantidade de indivíduos utilizados, ou seja, o impacto do número de animais na solução teste sobre a biodisponibilidade do contaminante sobre cada indivíduo, o meio em que são mantidos e o tempo de exposição são fatores que podem influenciar os diversos resultados encontrados (WAH CHU & CHOW 2002).

De acordo com as concentrações analisadas, a sensibilidade do *C. elegans* em relação aos outros nematóides testados encontra-se na faixa de  $\mu\text{M}$ , assim como quando comparado com a *Daphnia*, e mais sensível nesta ordem que peixes como bioindicadores (WAH CHU & CHOW, 2002). A sensibilidade dos diversos estágios larvais de *C. elegans* foi testada com cádmio numa exposição de 48h (WAH CHU & CHOW, 2002). As larvas L1 mostraram ser mais sensíveis que os adultos, apresentando um  $\text{LC}_{50}$  de 595  $\mu\text{M}$  de Cd, enquanto que nos adultos a  $\text{LC}_{50}$  foi de 550  $\mu\text{M}$ . Os mais tóxicos para o *C. elegans* foram o mercúrio, cobre, chumbo e cromo, com  $\text{LC}_{50}$  entre 20 e 300  $\mu\text{M}$ . Os menos tóxicos, níquel, cádmio, alumínio, cobalto, zinco e manganês ( $\text{LC}_{50}$  entre 400 e 550  $\mu\text{M}$ ). Para o Pb foram utilizados indivíduos em estágios larvais diversos, dando preferência aos maiores.

O *P. redivivus* respondeu como o esperado e de forma satisfatória. Claramente demonstrou sua sensibilidade à concentração crescente de xenobionte, além de ser o de manipulação mais fácil devido ao tamanho (é o maior entre os três). Seu cultivo é pouco exigente, ainda que necessite de meio estéril, ao contrário do *C. elegans*, muito mais suscetível a contaminações.

Apesar do *I. acetí* não necessitar de nenhum cuidado com esterilização, sua manipulação é mais complicada por ser mais delgado e menor que os outros dois, além de se movimentar freneticamente, dificultando a manipulação individual e as contagens. Em sua exposição ao xenobionte, demonstrou vulnerabilidade nas concentrações maiores, mas resistência na concentração menor, o que não aconteceu com os outros nematóides testados. Foi o único com diferença significativa no grupo controle, entre 0 h e 24 h, que pode se dever a problemas de manipulação ou outro problema metodológico; a dificuldade em visualizar estes animais para realizar sua contagem pode ser ainda outra explicação para estes dados.



Tendo como parâmetro a  $LC_{50}$ , *P. redivivus* mostrou uma sensibilidade intermediária ao Pb em relação ao *T. aceti* e *C. elegans*, mas uma menor sensibilidade para cromo e cobre se comparado com outros organismos testados para os mesmos contaminantes. Na presença de concentrações menores destes contaminantes, observou-se um efeito significativo sobre o crescimento e maturação de *Panagrellus*, demonstrando que estes metais podem causar efeitos sub-letais em baixas concentrações, como efeitos no crescimento e maturação sexual (NAHYR & DIAZ, *on line*).

O valor de  $LC_{50}$  é apenas um dos parâmetros a serem considerados em ensaios ecotoxicológicos (URA *et al*, 2002). A combinação das diversas respostas biológicas de um organismo é que representarão a ação do contaminante. A taxa de mortalidade demonstra somente o efeito agudo, não representando os efeitos sub-letais que podem implicar em uma série de eventos, não se restringindo ao indivíduo, mas a uma população e até a uma cadeia trófica (LAGADIC & CAQUET, 1998). O desenvolvimento pode ser mais sensível que a taxa de mortalidade (FAFENG Li *et al*, *in press*). Há autores que demonstram que o adulto grávido é mais sensível, enquanto outro defende que a análise do movimento é o mais indicado para testes toxicológicos para metais pesados. É necessário considerar outros aspectos como crescimento, reprodução e movimento (URA *et al*, 2000). Em *Acrobelloides* e *Aphelenchus* a concentração de benzopireno e cobre capaz de inibir o desenvolvimento foi menor que a concentração para o  $LC_{50}$ . A homologia de gens em *C. elegans* em relação aos dos mamíferos, e até aos do Homem, possibilita o uso de biomarcadores semelhantes como a inibição de acetilcolinesterase (COLE *et al*, 2004) e a vitelogenina (HOSHI *et al*, 2003).

Foi identificada homologia entre uma enzima encontrada em poucas espécies de fungos e plantas, em *C. elegans*. A fitoquelatina sintase é uma enzima que sintetiza fitoquelatinas, peptídeos que se ligam a metais pesado. Encontrou-se uma via fitoquelatina dependente para destoxificação de cádmio no *C. elegans*, podendo indicar a existência dessa via em outros animais, sendo de grande importância toxicológica (VATAMANIUK, 2001).

O uso de microscopia de fluorescência para medir o efeito de xenobiontes em *C. elegans* implica no uso de organismos mutantes que carreguem genes munidos do promotor de GFP (*green fluorescent protein*) (LINDBLOM *et al*, 2001; SWAIN *et al*, 2004) ou da luciferase (*firefly luciferase luminescence*). A *firefly luciferase* catalisa a oxidação da luciferina, uma reação

que requer ATP e produz luz. Quando outros substratos estão em excesso, a quantidade de luz emitida indica o nível de ATP, mostrando o estado metabólico do organismo. Assim, qualquer mudança que afete metabolismo será detectada nos níveis de luminescência (LAGIDO *et al*, 2001).

As bactérias produzem uma pequena porção de álcool, diacetil e outros produtos metabólicos que são naturalmente atrativos ao C. elegans (MATSUURA *et al*, 2004). Sabendo que há substâncias repelentes, como azida (HILLIARD & BARGMANN, 2002), ácidos (DUSENBERY *et al*, 1975) e outras que, de acordo com o uso as repostas são diferentes, como CO<sub>2</sub> e NaCl (DUSENBERY *et al*, 1975), a quimiotaxia é utilizada em estudos de fármacos (DENG, 2004), químicos (TAJIMA *et al*, 2001; HILLIARD & BARGMANN, 2002) e, por estar ligada diretamente aos padrões de resposta do sistema nervoso, é utilizada na caracterização de mutantes (DUSENBERY *et al*, 1975). Possibilita a avaliação de mudanças comportamentais após a exposição a xenobiontes, indicando alterações no sistema nervoso do animal e, sendo um teste de curta duração, de uma a duas horas, a obtenção de resultados é quase imediata. Esse modelo de teste é o próximo passo a ser testado em nosso laboratório para tentar averiguar respostas comportamentais dos vermes à presença do contaminante no meio.

## 6. Conclusões

- Os nematóides Caenorhabditis elegans, Turbatrix aceti e Panagrellus redivivus são sensíveis à presença de Pb, apresentando diferenças nas taxas de sobrevivência após o período de exposição de 24h.

- Considerando a manipulação, manutenção de cultura e resposta ao Pb, obteve-se melhores resultados com o Panagrellus redivivus.

- O Caenorhabditis elegans, apesar de possibilitar uma série de ensaios maior que o Panagrellus redivivus e Turbatrix aceti, é um organismo muito exigente quanto à manipulação e manutenção, não sendo por isso indicado para estudos ecotoxicológicos com as condições atuais de infra-estrutura de nosso laboratório.

- Os protocolos tidos como referência para coloração para microscopia óptica, DAPI, não corresponderam ao esperado, inviabilizando a avaliação morfológica dos organismos testados.



## 7. Referências Bibliográficas

- ACHAZI, R.K. Invertebrates in Risk Assessment: Development of a Test Battery and of Short Term Biotests for Ecological Risk Assessment of Soil. **J. Soils & Sediments**. V. 2, n.4, p. 174 – 178, 2002.
- BRENNER, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. **Genetics**. v. 77, p.71-94, 1974.
- CASSADA, R.C.; RUSSEL, R.L. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans. **Development Biology**. v.46, p.326-342, 1975.
- CHITWOOD, D.J.; LUSBY, W.R.; SALT, T.A. Sterol metabolism in the nematodes Panagrellus redidivus, Turbatrix aceti and Caenorhabditis elegans. **Comparative Biochemistry Physiology**. v. 86B, n. 1, p. 103-107, 1987.
- COLLE, R.D.; ANDERSON, G.L.; WILLIAMS, P.L. The nematode Caenorhabditis elegans as a model of organophosphorate-induced mammalian neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 194, p.248-256, 2004.
- CUNHA, F.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. Extratos vegetais com propriedades nematicidas e purificação do princípio ativo do extrato de Leucaena leucocephala. **Fitopatologia brasileira**. v.28, n. 4, 2003.
- DALLINGER, R. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and Perspectives. **Biochemistry Physiology**. Austria, v.113C, n.2, p.125-133, 1996.
- DENG, M.; MELL, J.C.A. Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. In press. Aceito em 2004.
- DUSENBERY, D.B.; SHERIDAN, R.E.; RUSSEL, R.L. Chemotaxis-mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. **Genetics**. v. 80, p.297-809. 1975.
- GEORGE, S.; GUBBINS, M.; MACINTOSH, A.; REYNOLDS, W.; SABINE, V.; SCOTT, A.; THAIN, J. A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (Platichthys flesus) subjected to estuarine pollution. **Marine Environmental Research**. n. 58, p. 571–575, 2004.
- GERALD, D.S.; ROBERTS, L.S. Phylum Nematoda: form, function, and classification. In: \_\_\_\_\_ **Foundations of Parasitology**. 5 ed., Sant Louis: Times Mirror/Mosby. 1996. 355-380.
- HILLIARD, M.; BARGMANN, C.I. C. elegans responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. **Current biology**. V. 12, p. 730-734, 2002.

- HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, A.A.J.; CAIRNS, J.J. **Handbook of toxicology**. Lewis Publishers, p.775, 1995.
- HOOD, T.E.; CALABRESE, E.J.; ZUCKERMAN, B.M.- Detection of an Estrogen Receptor in Two Nematode Species and Inhibition of Binding and Development by Environmental Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 47, p.74-81, 2000.
- HOPE, I.A. ***C. elegans***. Oxford: Oxford University Press, 1999, p.281.
- HOSHI, H.; KAMATA, Y.; UEMURA, T. Effects of 17 $\beta$ -estradiol, bisphenol A and tributyltin on germ cells of *Caenorhabditis elegans*. **Journal Veterinary Medicine Science**. v. 65, n.8, p. 881-885, 2003.
- LAGADIC, L.; CAQUET, T. Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives? **Environmental Health Perspectives supplements**. v.106, n. 52, p.593-611, 1998.
- LAGIDO, C.; PETTITT, J.; PORTER, A.J.R.; PATON, J.I.; GLOVER, L.A. Development and application of bioluminescent *Caenorhabditis elegans* as multicellular eukaryotic biosensors. **FEBS letters**. n. 493, p. 36-39, 2001.
- LEWIS, J.A.; FLEMING, J.T. Basic culture Methods. In: ***Caenorhabditis elegans: modern biological analysis of organism***. San Diego: H.F. Eds., Academic Press 1995, v.48, p.15-16.
- LI, F.; NEHER, D.A.; DARBY, B.J.; WEICHT, T.R. Observed differences in life history of nematodes *Aphelenchus* and *Acrobeloides* upon exposure to copper and benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology**. *In press*.
- LINDBLOM, T.H.; PIERCE, G. J.; SLUDER, A.D. A *C. elegans* orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. **Current Biology**. v.11, p.864–868, 2001.
- MARTYN-DIAZ, M. L.; VILLENA-LINCOLN, A.; BAMBER, S.; BLASCO, J.; DELVALLS, T.A. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas* **Chemosphere**. *In press* (2004).
- MATSUURA, T. OIKAWA, T.; WAKABAYASHI, T.; SHINGAI, R. Effect of simultaneous presentation of multiple attractants on chemotactic response of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neuroscience Research**. n. 48, p.419-429, 2004.
- MENZEL, R.; BOGAERT, T.; ACHAZI, R. A Systematic Gene Expression Screen of *Caenorhabditis elegans* Cytochrome P450 Genes Reveals CYP35 as Strongly Xenobiotic Inducible. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 395, n. 2, p. 158–168, 2001.
- NAHYR, M.; DIAZ, M.C. Evaluación de la toxicidad de Cr<sup>+6</sup>, Cu<sup>+2</sup> y el efluente de cromado de una industria metalmecánica utilizando *Panagrellus redivivus* como organismo de prueba.[on line]. Disponible na internet via WWW. URL: [www.icfes.gov.co/revistas/ingenve/No.38/Art1.html](http://www.icfes.gov.co/revistas/ingenve/No.38/Art1.html). Archivo capturado em 01 de novembro de 2004.

- POWER, R.S.; POMERAI, D.I. Effect of Single and Paired Metal Inputs in Soil on a Stress-Inducible Transgenic Nematode. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** V. 37, p. 503–511, 1999.
- SLUDER, A.E.; MAINA, C.V. Nuclear receptors in nematodes: themes and variations. **TRENDS in Genetics.** V.17, n.4, p.206-213, 2001.
- STEGEMAN, J.J. *et al.* Molecular responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of chemical Exposures and Effect. In: \_\_\_\_\_ **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.** Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehle Jr., P.P. & Bergan, H.L. Eds. Lewis Publishers. p.235-335, 1992.
- SULSTON, J.E.; HORVITZ, H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. **Developmental Biology.** n.56, p.110-156 (1977).
- SULSTON, J.E.; ESCHIERENBERG; WHITE, J.G.; THOMSON, J.N. The embryogenic of the nematode Caenorhabditis elegans. **Development Biology.** v.100, p. 64-119, 1983.
- SWAIN, S. C.; KEUSEKOTTEN, K.; BAUMEISTER, R.; STURZENBAUM, S.R. C. elegans Metallothioneins: New Insights into the Phenotypic Effects of Cadmium Toxicosis. **Molecular Biology.** v.341, p. 951-959, 2004.
- TAJIMA, T., TAKIGUCHI, N.; KATO, J.; IKEDA, T.; KURODA, A.; OHTAKE, H. Mutants of the Nematode Caenorhabditis elegans That Are Defective Specifically in Their Attraction to Cycloheximide. **Journal of bioscience and bioengineering.** v.96, n.2, p.149-153, 2003.
- TARTARA, C.P.; NEWMAN, M.C.; MCCLOSKEY, J.T.; WILLIAMS, P.L. Predicting relative metal toxicity with ion characteristics: Caenorhabditis elegans LC<sub>50</sub>. **Aquatic Toxicology.** v.39, p.279-290, 1997.
- TARTARA, C.P. NEWMAN, M.C.; MCCLOSKEY, J.T.; WILLIAMS, P.L. Use characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions: Caenorhabditis elegans LC<sub>50</sub>. **Aquatic toxicology.** V.42, p.225-269, 1998.
- URA, K. *et al.* Aquatic acute toxicity testing using the nematode Caenorhabditis elegans. **Journal of Health Science.** v. 48, n.6, p.583-582, 2000.
- VATAMANIUK, O.K. A new pathway for heavy metal detoxification in animals phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in Caenorhabditis elegans. **Biological Chemistry.** Vol. 276, n. 24, p. 20817-20820, 2001.
- WAH CHU, K.; CHOW, K.L. Synergistic toxicity of multiple heavy metals in revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. **Aquatic Toxicology.** v. 61, p.53-64, 2002.
- WALBOT, V.; HOLDER, N. The development of Caenorhabditis elegans In: \_\_\_\_\_ **Developmental Biology.** New York: Random House, p.603-626, 1987.

WALKER, C.H., *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres. pp.321,1996.

WINTER, C.E. *C. elegans* on the web: bioinformatics used to serve a worldwide scientific community. [on line] Disponível na internet via WWW. URL:[http://icb.usp.br/~cewinter/bioinfo\\_ce.pdf](http://icb.usp.br/~cewinter/bioinfo_ce.pdf). Arquivo capturado no dia 21 de setembro de 2004.

WOOD, W.B. and the Community of *C. elegans* Researchers. Methods In: \_\_\_\_\_ **The nematode *Caenorhabditis elegans***. ColdSpring Harbor Laboratory. p. 587-606,1988.

HOOD, T. E.; CALABRESE, E.J.; ZUCKERMAN, B. M. Detection of an Estrogen Receptor in Two Nematode Species and Inhibition of Binding and Development by Environmental Chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 47, p.74-81,2000.